THE UTILITY OF SHORT-TERM TESTS FOR CARCINOGENS

A TECHNICAL REVIEW

Canadian Centre for Occupational Health and Safety

Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail

250 Main St. E/ 250 rue Main est
Hamilton Ontario Canada L8N 1H6

P83-4E

THE UTILITY OF SHORT-TERM TESTS FOR CARCINOGENS: A TECHNICAL REVIEW

BY

BERNARD C K CHOI
DEPARTMENT OF PREVENTIVE MEDICINE AND BIOSTATISTICS
UNIVERSITY OF TORONTO

NOVEMBER, 1982

PREPARED FOR THE

CANADIAN CENTRE FOR OCCUPATIONAL HEALTH AND SAFETY

P83-4E

CCOHS/CCHST
[illegible]
[illegible]

THE UTILITY OF SHORT-TERM TESTS FOR
CARCINOGENS: A TECHNICAL REVIEW

CCOHS IDENTIFICATION NUMBER P83-4E

ISBN LISTING 0-660-1556-5

DSS CATALOGUE CC273-2/83-4E

This publication is available in both official languages.

Cette publication est disponible dans les deux langues officielles.

While the Centre endeavours to ensure the accuracy and completeness of information provided, it is understood that the Centre makes no warranty as to the accuracy or completeness of such information and assumes no liability for any damages or loss suffered as a result of any inaccuracy or incompleteness therein.

Published 1983

Additional copies available upon request.

CCOHS/CCHST
[illegible] Main Street East/[illegible] rue Main est.
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

SUMMARY

The number of chemicals in use in industry has grown immensely in recent decades. Some of these chemicals are potential occupational carcinogens and need to be identified and controlled to prevent human cancer. Rapid, inexpensive and reliable short-term tests can be used in screening for potential occupational carcinogens and in setting priorities for control measures and further testing.

Short-term tests are based on a variety of biological and biochemical changes which have been associated with the actions of carcinogens. Over 100 short-term tests have been proposed for use in detecting carcinogens. Of these, the Ames test using Salmonella bacteria and certain tests using mammalian cells (mutation, chromosome aberration, DNA repair synthesis, sister-chromatid exchange, micronucleus test and cell transformation) are widely used.

These tests are usually performed on isolated cells which do not actually become cancerous. Thus, their interpretation in the context of human carcinogenicity must be made with caution. The statistical concepts of specificity, sensitivity and predictive value are introduced to aid this interpretation. Due to the inherent shortcomings of the tests and the small fraction of chemicals estimated to be carcinogenic, it is expected that many chemicals which are positive in short-term tests will prove to be noncarcinogenic: in contrast, almost all chemicals which are negative in the tests are likely to be noncarcinogenic. Short-term tests cannot at present replace long-term animal assays and are likely to be most useful in screening chemicals prior to animal testing. Further work is indicated in the validation of a few promising short-term tests and the statistical combination of their results to give a more accurate prediction of carcinogenicity.

INTRODUCTION

"We are living in a sea of chemicals that have not been tested for mutagenicity and carcinogenicity(1)." This sea of chemicals is being generated in part by the great synthetic capability of modern industry. By 1977, the computer registry of the American Chemical Society had recorded more than four million individual chemical substances. Moreover, the number of chemicals in the registry has been growing at an average rate of about 6,000 per

week(2). Of this enormous population of chemicals, only about 6,000 have been tested for carcinogenicity, and about 1,000 have been reported to be carcinogenic(3). This initial group of tested compounds was selected because of a high probability of carcinogenicity and only a few per cent of the total population of chemicals may turn out to be carcinogenic. Nevertheless it seems clear that many more chemicals will be added to the list of potential human carcinogens(4).

The carcinogenicity of chemicals to humans can be evaluated directly only by the study of cases of cancer in humans and their associations with exposure to chemicals. Other methods such as animal testing and short-term testing are, at best, indirect measures of risk to humans.

The study of the patterns of disease and mortality in the human population and the factors that determine their distribution is called epidemiology. It is usually carried out after the fact: the incidence or prevalence of a particular cancer is found for a group of people who have had an exposure to a particular chemical. This "observed" cancer incidence or prevalence is then compared to the "expected" value for this cancer in the control population (usually a matched group of workers not exposed to the chemical of interest)(5). Occupational carcinogens detected in this way include the bladder carcinogen 2-naphthylamine(6) and the lung carcinogen asbestos(7).

Epidemiological studies are expensive and time consuming. Moreover, due to the complex exposure patterns in a workplace and problems with record keeping or recall, it is often difficult to pinpoint a specific chemical as an occupational carcinogen. Hence epidemiology usually designates areas of high risks or confirms suspected risks. It is rather insensitive in determining the carcinogenic risk of individual chemicals(8).

Animal study is an alternative for the evaluation and prediction of human carcinogens. The advantages of animal testing are that most human carcinogens have been shown to induce cancers in test animals, that animals can be treated with known doses of chemicals, and that cancers develop faster in small animals such as mice and rats than in humans.

Animal tests involve the treatment of experimental animals, usually rodents, by a relevant route of administration (orally, by inhalation, by implantation, or by skin painting) with the suspected chemical at dose levels which are high but not acutely toxic. The animals are kept under observation for most of their lifetimes (usually one to two years) and are carefully examined for tumors.

Animal carcinogenicity tests also have some disadvantages. First, they are time consuming and costly: a test of a single chemical at two-dose levels in two species may require 3 years and cost $500,000US(9). Second, because of the costs, relatively small numbers of animals are examined (usually 300 or less). Consequently the tests are limited in sensitivity and weak carcinogens may not be detected. Third, laboratory animals are not just scaled-down human beings and may not respond to a chemical in the same way as humans(10). For these and other reasons the results of animal studies must be interpreted carefully and extrapolated to human beings with caution.

SHORT-TERM TESTS

In recent years, a large number of short-term tests have been developed as fast and inexpensive methods to detect potential human carcinogens. The tests use a variety of cells, tissues and chemical processes and detect changes which are associated with the development of cancer. Since the key events during carcinogenesis are not well understood, short-term tests are based on correlations between the actions of the test material and of known carcinogens in the same test. The test systems are still more "distant" to human beings than are animal tests and the results of short-term tests have to be interpreted with even more caution. Nevertheless, these tests have found widespread use as general screening tests for carcinogens.

Short-term tests may be classified into the following twelve groups according to the type of change detected:

1. **Tests Based on Mutagenesis.** These tests are based on the strong correlation between the carcinogenic (cancer-causing) and mutagenic (mutation-causing) activities of chemicals. Mutations are permanent inherited changes in the structure of the genetic material DNA: there is convincing evidence that certain specific mutations are among the initial events in the development of cancer(11).

One mutagenicity test, the Salmonella typhimurium/mammalian microsome test (Ames test)(1), is currently the most widely used short-term test: results of testing of over 12,000 chemicals have been published(12). This test is described in some detail to illustrate the features of short-term tests.

The basis of the test was the development of a series of strains of the bacteria Salmonella typhimurium. These strains have been mutated in various ways but in all cases they are unable to grow in the absence of the chemical histidine. If treatment of the bacteria with a carcinogen causes the specific mutation to be reversed then the bacteria can make their own

histidine and can grow into a "colony" which can be detected readily. Mutations are scored by counting the number of colonies. In general, the higher the mutagenic potency of the test substance, the greater is the number of colonies. However the formation of colonies, and perhaps the detection of mutagenicity, can be prevented if the test substance is toxic enough to kill the bacteria.

The tester strains detect different classes of mutagens (e.g. TA1537, TA1538, TA97 and TA98 for frameshift mutagens and TA1535 and TA100 for base pair substitution mutagens)(13,14). Only certain strains may respond to a specific mutagen (and presumed carcinogen). From one to six strains of Salmonella typhimurium may be used in a single test. The accuracy of the test increases with the number of strains used, as does the cost.

The tester strains have been altered in other ways which increase their sensitivity to mutagens. Some strains contain a mutation (uvrB gene) rendering them unable to repair certain kinds of DNA damage(13). The permeability of the cell walls of Salmonella strains to chemicals has been increased by a mutation (deep rough rfa)(15). Finally, there is a further set of strains containing the drug resistance plasmid pKM 101(16).

One of the most important developments in short-term testing was the introduction of a liver extract ("microsomes" or "S-9"), usually from rats, containing enzymes which can convert many carcinogens to their active forms. This process is widely referred to as "metabolic activation." The use of this extract has greatly improved the success rate of the test(17) and is used in many other short-term tests. As a result of all these efforts the Ames test is able to detect very small amounts of a mutagen, usually micrograms (10^{-6} grams), and in some cases even nanograms (10^{-9} grams), of material.

Results of the Ames test in many laboratories over many years show an impressive correlation between mutagenicity and carcinogenicity. It detects most organic chemicals that are recognized human carcinogens except benzene and diethylstilbestrol(18). Most chemicals which are carcinogenic in animal tests have mutagenic activity which can be detected in the test(19). Similarly, the strains have generally failed to detect mutagenic activity for most chemicals which were noncarcinogenic in animal tests. The major failing of the test has been its lack of response to certain carcinogenic metals, several of which are carcinogenic in humans.

Mutagenesis tests have been developed using other bacterial strains such as Escherichia coli(20) and B. subtilis(21) and mammalian cells such as human fibroblasts, mouse cells and Chinese hamster cells(22,23). Mammalian cell tests offer the

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est.
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

potential advantages of similarity to normal human cells, including transport and metabolism of chemicals and chromosomal structure. However, these tests are not as sensitive as was expected and may be considerably more difficult to perform. In practice the Ames test is almost universally used in screening programs with other mutation tests being used mainly for confirmation or elaboration of its results.

2. **Tests Based on Chromosomal Aberrations.** Chromosomes are thread-like structures in the cell nucleus and can be seen under a microscope. They are composed of long molecules of DNA which carry the cell's genetic information. Most carcinogens cause chromosomal aberrations (visible breaks and other damage); there is also a close association between chromosomal aberrations and the development of cancer(24). This provides the basis for the study of chromosomal aberrations in mammalian cells as a short-term test(11,24,25,26). Lymphocytes (one type of white blood cells from humans or test animals) are commonly used to assess the effects of chemicals on chromosomes. Cultured mammalian cells and mouse spermatogonial cells are also often used. A major advantage of this test is that it can be done using cells from exposed humans or animals (in vivo exposure). This test agrees fairly well with the Ames test and animal assays(24) but appears to give a somewhat higher frequency of false positive results: some (apparently) noncarcinogenic chemicals and other factors such as viral infection can increase the frequency of aberrations.

3. **Tests Based on Sister-Chromatid Exchange (SCE).** Sister chromatids are the two identical halves of a chromosome in a dividing cell. Sister-chromatid exchanges (SCEs) are interchanges of DNA between the two chromatids. Exchanges are thought to occur during repair of damaged DNA and SCEs are counted as a measure of DNA damage. They can be visualized readily in chromosomes from many types of mammalian cells(26,27,28). The SCE technique is relatively simple to perform and analyse and can be done using cells such as lymphocytes (white blood cells) from an exposed human and spermatogonial or bone marrow cells from a treated experimental animal. The test shows a greatly enhanced sensitivity to some carcinogens but not to others(29). Consequently SCE tests cannot yet be accepted as quantitative indicators of carcinogenic risk.

4. **Tests Based on Micronucleus Formation.** Micronuclei are fragments of chromosomes in the cell outside the nucleus. They result from breakage of chromosomes (DNA) or a malfunction of cell division(30,31). Micronuclei can be observed in blood or bone marrow cells from animals which have been exposed to certain carcinogens. However, it has a lower success rate in detecting carcinogens and noncarcinogens than the Ames test.

5. **Tests Based on Repair of Damaged DNA.** Chemical damage to cellular DNA is repaired by the action of a system of enzymes. The measurement of this repair provides an indication of the ability of a chemical to damage DNA. The amount of DNA synthesis occurring during repair is usually measured from the uptake of a radioactive marker during the period immediately following exposure to the test chemical(32,33). Several DNA repair test systems are now available which use cells from bacteria, yeast and mammals, including humans(34). DNA repair tests detect effects of chemicals which may not be seen in the mutagenesis assays. Thus they are complementary to the mutagenesis tests and are often combined with mutagenesis tests as part of short-term test batteries. A major disadvantage of DNA repair tests is that they also measure DNA-damaging events which may not be associated with carcinogenesis.

6. **Tests Based on Cell Survival.** Cells deficient in repair of DNA are killed more easily by DNA-damaging agents than are normal (wild-type) bacteria. This difference offers a simple method for detecting DNA damage by measuring the survival of cells with varying DNA repair capacities. Bacterial strains deficient in excision repair(35) or recombination repair(36) and repair-deficient human Xeroderma pigmentosum cells(37) have been used. To date this method has been used more in research than in screening applications.

7. **Tests Based on Malignant Transformation.** Some types of cultured mammalian cells can be transformed into cancer cells by treatment with carcinogens: these cells will form tumors if injected into suitable animals. The transformed cells also have other altered properties which can be used as indicators in short-term tests(38,39,40). The most common indicators are the ability of the cells to form colonies similar to those characteristic of cancer cells. Two studies have shown prediction of carcinogenicity similar to that of the bacterial mutagenicity tests(41,42). Limitations to the current use of cell transformation as a test method include a high rate of "spontaneous" cell transformation, problems in defining criteria equating in vitro transformation with malignancy, and the technical skill needed to perform the assay.

8. **Tests Based on Accelerated Tumor Formation.** Various means of accelerating tumor formation to reduce the time needed for carcinogen testing have been proposed. These include the use of newborn animals(43), implanting embryonal tissues together with carcinogens into adult animals(44), and immunosuppression(45). However, these accelerated carcinogen testing experiments still require several months or longer and sometimes acceleration does not occur.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est.
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

9. **Tests Based on Teratogenesis.** Many carcinogens are also teratogens (induce birth defects) and teratogenesis has been proposed as an indicator of potential carcinogens(46). A variety of carcinogens including derivatives of urethane and benz(a)anthracene have produced teratogenic changes in the offspring of treated female rodents(47). Studies to date indicate that teratogenicity is not highly correlated with carcinogenicity(46,48).

10. **Tests Based on Cytological Alterations.** Carcinogens cause changes in the structure and appearance of some cells and these changes can be used as a basis of screening. These include nucleolar changes(49) and microsome degranulation Rabin's test)(50). The size of the nucleolus was increased by thioacetamide but decreased by acridine orange and actinomycin D(51). Rabin's test predicted the carcinogenicity of aromatic amines well but was unsuccessful with other chemicals(52). These tests have not been extensively validated.

11. **Tests Based on Biological Changes.** These tests are based on changes in the growth or appearance of certain tissues following treatment with carcinogens. They include the sebaceous gland test(53,54) and implant test(41). These tests have not been well studied and appear to be used primarily in conjunction with animal carcinogen assays. They may also be useful as part of a battery of tests.

12. **Tests Based on Biochemical Reactions.** A number of chemical reactions have been identified which are characteristic of certain classes of chemical carcinogens. These include the tetrazolium reduction test(55), biphenyl test(56), iodine colour test(57) and acridine colour test(58). Since these tests are specific for certain kinds of carcinogens they are considered to be unsuitable for general use in screening programs(41).

From this brief overview of short-term tests it is clear that a large number of short-term tests are available for carcinogen detection. In fact Hollstein and McCann(18) have identified over 100 short-term assays. Among these tests, the Ames test is by far the most popular test and is usually adopted for routine screening in many laboratories. Other tests that are commonly used include mutation of mammalian cells, chromosomal aberration, DNA repair synthesis, sister-chromatid exchange, micronucleus formation, and cell transformation.

Most of the short-term tests which are at present widely used for the detection of potential carcinogens are assays for the mutagenic activity of chemicals or of their ability to damage DNA(11). A good correlation between chemicals causing cancer and those causing mutation has been demonstrated(16,59,60), which suggests that a common molecular event may be shared by the two processes. However short-term tests can mimic only a small

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

part of the total complex process of carcinogenesis(61). Thus, their results must be interpreted with care if any reference to carcinogenicity is to be made.

THE VALIDITY OF SHORT-TERM TESTS

In order to appreciate the role of short-term tests as predictors for the carcinogenicity of chemicals the following terms are defined:

The VALIDITY of a test is defined as the accuracy with which a test measures what it is intended to measure. A carcinogen-screening test should provide a preliminary indication of which chemicals are carcinogenic and which are not. This is referred to as the validity of the test. Validity has two components: sensitivity and specificity. SENSITIVITY is defined as the ability to identify correctly the substances that produce cancer(62,63). SPECIFICITY is defined as the ability to identify correctly those which do not produce cancer.

Because short-term tests do not have the production of tumours in animals as an end point, such tests have to be validated using a number of known carcinogens and noncarcinogens. The extent to which the screening results agree with those derived from human data and animal tests provides a measure of sensitivity and specificity. An ideal screening test would be 100 per cent sensitive and 100 per cent specific. In practice this does not occur; sensitivity and specificity are usually inversely related. That is, one usually achieves high sensi- tivity at the expense of low specificity.

Many studies have been carried out to evaluate the success rates of short-term tests in identifying carcinogens and non-carcinogens (Table, p. 14). The Salmonella/Ames test is the best studied and most extensively validated short-term test and can exemplify the use of statistical concepts. So far the largest validation study on the Ames Test was carried out by McCann and co-workers who applied the test to about 300 chemicals(19). Among 175 carcinogens tested, 157 (90%) gave positive results and 87% (94/108) of the noncarcinogens gave negative results.

In this study the screening level was set at 0.01 revertants per nanomole (nmol, 10^{-9} mole), i.e. any test result greater than this screening level was considered to be positive. A sensitivity of 90% and a specificity of 87% were obtained. Had the screening level been set higher, say 0.1 revertants per nmol (this is equivalent to treating all weak mutagens as nonmutagens) the sensitivity would have become 81% (141/175) and specificity would have been 90% (97/108).

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est.
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

When carcinogens are labelled negative, the test results are referred to as false negatives. When noncarcinogens are called positive, the test results are false positives. Naturally, a sensitive test will create few false negatives and a specific test will give few false positives.

An important issue in carcinogenicity testing is the ability of tests to predict carcinogenicity(64). Sensitivity and specificity are measures of the accuracy with which a test identifies carcinogens and noncarcinogens. They are not measures of the accuracy to predict carcinogenicity and noncarcinogenicity. At the time a test is first evaluated, it is performed on a group of carcinogens and noncarcinogens and the indices of sensitivity and specificity are calculated. If the results seem sufficiently encouraging, the test might be accepted into general laboratory usage.

While the original investigators started with a group of substances for which carcinogenicity had already been confirmed, the investigators who later use the screening test must start with substances whose carcinogenic properties are unknown. The purpose of the test is to predict whether the substance can be carcinogenic or not. In receiving the result of the test, an investigator therefore wants to know its predictive accuracy, not its sensitivity or specificity. If the test result is positive, what is the probability that the substance is a carcinogen? If the test result is negative, what is the probability that the substance is a noncarcinogen? To answer these two questions, a different set of indices, the predictive values, have to be defined.

PREDICTIVE VALUE OF A POSITIVE TEST (PV+) is defined(65,62) as the probability that a substance with a positive test result is a carcinogen. It is estimated by the proportion of carcinogens among the substances which are positive to the test. PREDICTIVE VALUE OF A NEGATIVE TEST (PV-) is defined as the probability that a substance with a negative test result is a noncarcinogen. It is estimated by the proportion of noncarcinogens among the substances which are negative to the test.

Continuing the example of the validation study of McCann et al. (1975b), the Ames test has the following properties:

Sensitivity	= 90% (157/175)
Specificity	= 87% (94/108)
False positive rate	= 13% (14/108)
False negative rate	= 10% (18/175)
PV+	= 92% (157/(157+14))
PV-	= 84% (94/(94+18))
Proportion of carcinogens	= 62% (175/(175+108))

CCOHS/CCHST
250 Main Street E. 250 rue Main
Hamilton, Ontario, Canada L8N

In this validation study, the group of test substances consists of 62% carcinogens and 38% noncarcinogens. In a real-life situation, however, the proportion of carcinogens (or the probability that a test substance selected at random might be a carcinogen) is likely to be much lower, and will vary according to the class of chemicals to which the test substance belongs. Had the validation study been applied to a group of substances with a proportion of carcinogens of 1%, with the same sensitivity and specificity the PV+ would have dropped drastically to 6.5% and the PV- increased to 99.9%. It would be very disappointing to learn that given that a substance has a positive result in the Ames test, the probability that it is a carcinogen is only 6.5%(59,66,67,68). The low value of PV+ is due to the large number of noncarcinogens (in this case 99%) which give rise to a large total number of false positives in spite of a low false positive rate. If the proportion of carcinogens is assumed to be 10% in this example then the PV+ increases to about 43% and the PV- drops slightly to 98.7%.

ORIGINS OF FALSE-POSITIVE AND FALSE-NEGATIVE RESULTS

There is little prospect that any short-term test can be improved to give both 100% sensitivity and specificity. There may always be a finite level of false-positive and false-negative results. Where do the false positives and false negatives come from? Taking the Ames test as an example, the false positives and false negatives may arise from several sources(10,52,69,70,71):

False positives. "Noncarcinogens" positive in the Ames test may be due to the following reasons:

1. Inadequacies in animal carcinogenicity tests. For example, the food additive furyl furamide gave negative results in two animal tests but was eventually shown to be a weak carcinogen: the "noncarcinogen" was in fact a carcinogen. Other compounds such as sodium azide can give equivocal results in animal assays. If a true carcinogen is assumed noncarcinogenic on the basis of an animal assay then a positive short-term test result will be taken as a false positive.

2. Specific bacterial activation of chemicals. For example, nitro-compounds are activated to mutagens by nitro-reductases in the bacteria. These enzymes are not common in mammalian cells and treated animals would not likely develop tumors.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

3. Oversensitivity of some tester strains due to a defective repair system. For example, they could be reverted by chance exposure to ultraviolet light and give false positive test results.

4. Mutagenic impurities. For example, samples of 5-hydroxy-2-acetylaminofluorene have been shown to be mutagenic because of the presence of an impurity. Thus it is important to test the pure compound, the technical compound and common impurities.

5. Compounds enhancing the growth of cells in the assays. Compounds which stimulate cell growth may increase the chance that spontaneous mutations (false positives) can occur.

False negatives. Carcinogens negative in the Ames test may be attributed to the following reasons:

1. Inadequacies in the in vitro metabolic activation system. If the substance is left to stay for a longer period with the liver cell preparation, there is a higher chance of being activated. For example, the mutagenicity of dimethylnitrosamine can be detected by a preincubation at high enzyme concentrations. Moreover, the isolated liver extract may be an inadequate model for the complex biochemical processes involved in the detoxication and activation of carcinogens in the intact body. For example, the natural material cycasin is converted to methylazoxymethanol (which is carcinogenic) by microorganisms in the intestine and not by the liver.

2. Bacterial toxicity of the compound which may mask the mutagenic effect. Certain compounds may be much more toxic to bacteria than to animals. For example, some chlorinated pesticides can be detected as mutagens only in a narrow range of doses just below the concentrations which kill the bacteria.

3. Lack of tester strains sensitive to particular mutagenic effects. For example, the new tester strain TA94 can detect mitomycin C and malondialdehyde which were not detected by other strains.

4. Mutagens which are unique to animal cells and cannot be detected using bacterial tests. An example is griseofulvin which interferes with microtubule formation. Since microtubules are absent in bacterial cells, griseofulvin does not affect the bacteria.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

5. Carcinogens using a mechanism other than somatic mutation. For example, hormones may cause cancer in animals by affecting cell growth.

6. Chemical reactions and pH effects in the plate assay. Certain chemicals may be mutagenic only under special conditions which are not duplicated in the standard assay. For example, it can be difficult to test chemicals which react with chemical components of the assay system, which form insoluble compounds, or which are inactive at the pH used in the assay. If these problems are anticipated then a specially modified assay may be required.

No test is perfect and there is an upper limit of accuracy which any test can achieve. It could be counterproductive to develop a test, find that it is imperfect, drop it, and try to develop another test.

There are two courses available at the present stage. First, the relatively more accurate short-term tests that are available can be improved, standardised and more fully validated so that the accuracy coefficients are better estimated. So far the sensitivity of the Ames test in various validation studies ranges from 63% to 95% (Table, p. 14), which is obviously inadequate. Secondly, a number of screening tests, say five, may be grouped to form a test battery to replace the single-test approach. This is particularly important since there may be many mechanisms for the actions of carcinogens and a battery of tests may be needed to detect these different effects. For example, positive results in 3 tests and negative results in 2 tests are more informative and meaningful than a negative or positive result in a single test. Statistical treatments to combine results from various short-term tests are currently under investigation.

At the present stage of development of short-term carcinogenicity tests, it appears that no test or battery of tests can replace long-term animal experiments in determining the carcinogenicity of a substance. They serve primarily as prescreens to select substances which can be submitted with priority for bioassay in experimental animals.

Few people would disagree with attempts to remove a recognizable source of potential hazard, such as the presence of a potent animal carcinogen in the working environment, but many would question whether abrupt action should be taken on finding that a glue contained chemicals mutagenic to Salmonella typhimurium. There is still a long way to go with short-term carcinogenicity testing.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

SUCCESS RATES OF SOME SHORT-TERM TESTS

Numbers in brackets indicate the number of carcinogens or noncarcinogens tested

Test System	Sensitivity	Specificity	Reference
Salmonella/Ames	90% (175)	87% (108)	19.
Sammonella/Ames	63% (27)	79% (33)	72.
Salmonella/Ames	72% (65)	78% (26)	73.
Salmonella/Ames	91% (58)	93% (62)	41.
Salmonella/Ames	92% (98)	---	60.
Salmonella/Ames	65% (36)	81% (16)	30.
Salmonella/Ames	71% (51)	---	18.
Salmonella/Ames	95% (22)	44% (27)	71.
Salmonella/Ames	76% (82)	57% (7)	74.
E. coli pol A mutagenesis	69% (58)	75% (24)	73.
E. coli pol A mutagenesis	57% (44)	---	18.
Cell transformation	91% (58)	97% (62)	41.
Cell transformation	81% (26)	---	18.
Rabin's test	71% (58)	71% (62)	41.
Subcutaneous implants	37% (58)	95% (62)	41.
Sebaceous gland suppression	67% (58)	64% (62)	41.
Tetrazolium reduction	40% (58)	73% (62)	41.
Micronucleus	43% (36)	81% (16)	30.
Micronucleus	68% (22)	---	18.
Micronucleus	58% (59)	82% (22)	75.
Abnormal sperm	65% (36)	62% (16)	30.
Abnormal sperm	68% (19)	---	18.
Unscheduled DNA synthesis	55% (22)	---	18.
DNA repair	94% (16)	---	18.
Dominant lethal	32% (25)	---	18.
Sister-chromatid exchange in vitro	92% (26)	---	18.
Sister-chromatid exchange in vivo	85% (13)	---	18.
Chromosome aberration in vitro	48% (27)	73% (33)	72.
Chromosome aberration	78% (27)	---	18.
Chromosome aberration	82% (17)	---	18.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

REFERENCES

1. Ames, B.N.; McCann, J.; Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutation Research. Vol. 31, no. 6 (1975). p. 347-364

2. Maugh, T.H. Chemicals : how many are there? Science. Vol. 199, no. 4325 (1978). p. 162

3. Saffiotti, U.; Wagoner, J.K. Occupational carcinogenesis. Annals of the New York Academy of Science. Vol. 271 (1976). p. 1-516

4. Acheson, E.D. Towards a strategy for the detection of industrial carcinogens. British Journal of Cancer. Vol. 44, no. 3 (1981). p. 321-331

5. Kleinbaum, D.G.; Kupper, L.L.; Morgenstern, H. Epidemiologic research : principles and quantitative methods. Belmont : Lifetime Learning Publications, 1982

6. Case, R.A.M.; Hosker, M.E.; McDonald, D.B.; Pearson, J.T. Tumours of the urinary bladder in workman engaged in the manufacture and use of certain dyestuff in intermediates in the British chemical industry. British Journal of Industrial Medicine. Vol. 11 (1954). p. 75-104

7. Asbestos (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man). Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1976

8. Crombie, I.K. The limitations of case-control studies in the detection of environmental carcinogens. Journal of Epidemiology and Community Health. Vol. 35, no. 4 (1981). p. 281-287

9. Clayson, D.B. Comparison between in vitro and in vivo tests for carcinogenicity: an overview. Mutation Reseach. Vol. 75, no. 2 (1980). p. 205-213

10. Ashby, J. The unique role of rodents in the detection of possible human carcinogens and mutagens. Mutation Research. Vol. 115, no. 2 (1983). p. 177-213

11. Brusick, D. Principles of genetic toxicology. New York : Plenum Press, 1980

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario. Canada L8N 1H6

12. Environmental Mutagen Information Center Newsletter. No. 2, Winter 1981/82

13. Ames, B.N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: Hollaender, A., ed. Chemical mutagens : principles and methods for their detection. New York : Plenum, 1971. Vol. 1. p. 267-282

14. Levin, D.E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. A new salmonella tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens: a run of cytosines as a mutational hot-spot. Mutation Research. Vol. 94, no. 2 (1982). p. 315-330

15. Ames, B.N.; Durston, W.E.; Yamasaki, E.; Lee, F.D. Carcinogens are mutagens : a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. In: Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 70 (1973). p. 2281-2285

16. McCann, J.; Springarn, N.E.; Kobori, J.; Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens : bacterial tester strains with R factor plasmids. In: Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 72 (1975). p. 979-983

17. Ames, B.N.; Lee, F.D.; Durston, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. In: Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 70 (1973). p. 782-786

18. Hollstein, M.; McCann, J. Short-term tests for carcinogens and mutagens. Mutation Research. Vol. 65, no. 3 (1979). p. 133-226

19. McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test : assay of 300 chemicals. In: Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 72 (1975b). p. 5135-5139

20. Green, M.H.L.; Muriel, W.J. Mutagen testing using trpsup + reversion in Escherichia coli. Mutation Research. Vol. 38, no. 1 (1976). p. 3-32

21. Tanooka, H. Development and applications of Bacillus subtilis test systems for mutagens, involving DNA-repair deficiency and suppressible auxotrophic mutations. Mutation Research. Vol. 42, no. 1 (1977). p. 19-32

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

22. Chu, E.H.Y. Induction and analysis of gene mutations in mammalian cells in culture. In: Hollaender, A., ed. Chemical mutagens : principles and methods for their detection. New York : Plenum, 1971. Vol. 2. p. 411-444

23. Mutagenesis assays with mammalian cells. In: Long-term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man). Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1980. Suppl. 2. p. 107-133

24. Cytogenic damage as an endpoint in short-term assay systems for detecting environmental carcinogens. In: Long-term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man). Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1980. Suppl. 2. p. 227-244

25. Lilly, L.J.; Bahner, B.; Magee, P.N. Chromosome aberrations induced in rat lymphocytes by N-nitroso compounds as a possible basis for carcinogen screening. Nature. Vol. 258, no. 5536 (1975). p. 611-612

26. Nishio, A.; DeFeo, F.; Cheng, C.C.; Uyeki, E.M. Sister-chromatid exchange and chromosomal aberrations by DHA, and related anthraquinone derivatives in Chinese hamster ovary cells. Mutation Research. Vol. 101, no. 1 (1982). p. 77-86

27. Perry, P.; Wolff, S. New Giemsa method of differential staining of sister chromatids. Nature. Vol. 251, no. 5471 (1974). p. 156-158

28. Takehisa, S.; Wolff, S. Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by carcinogenic mutagens requiring metabolic activation. Mutation Research. Vol. 45, no. 2 (1977). p. 263-270

29. Perry, P.; Evans, H.J. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature. Vol. 257, no. 5531 (1975). p. 121-125

30. Heddle, J.A.; Bruce, W.R. Comparison of tests for mutagenicity or carcinogenicity using assays for sperm abnormalities, formation of micronuclei, and mutations in Salmonella. In: Hiatt, H.; Watson, J.D.; Winsten, J.A., eds. Origins of human cancer. Book A. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1977. p. 1549-1557

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

31. Cole, R.J.; Taylor, N.; Cole, J.; Arlett, C.F. Short-term tests for transplacentally active carcinogens. I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. Mutation Reseach. Vol. 80, no. 1 (1981). p. 141-157

32. San, R.H.C.; Stich, H.F. DNA repair synthesis of cultured human cells as a rapid bioassay for chemical carcinogens. International Journal of Cancer. Vol. 16, no. 2 (1975). p. 284-291

33. Zelle, B.; Bootsma, D. Repair of DNA damage after exposure to 4-nitroquinoline-1-oxide in heterokaryons derived from Xeroderma pigmentosum cells. Mutation Reseach. Vol. 70 (1980). p. 373-381

34. Williams, G.M. The status of in-vitro test systems utilizing DNA damage and repair for the screening of chemical carcinogens. Association of Official Analytical Chemists. Journal. Vol. 62, no. 3 (1979). p. 857-863

35. Garner, R.C.; Miller, E.C.; Miller, J.A. Liver microsomal metabolism of afla toxin B-1 to a reactive derivative toxic to Salmonella typhimurium TA 1530. Cancer Research. Vol. 32, no. 10 (1972). p. 2058-2066

36. Kada, T.; Hirano, K.; Shirasu, Y. Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with bacillus subtilis. In: de Serres, F.J.; Hollaender, A., eds. Chemical mutagens: principles and methods for their detection. New York : Plenum Press, 1980. Vol. 6. p. 149-173

37. Stich, H.F.; San, R.H.C. DNA repair synthesis and survival of repair deficient human cells exposed to the K-region epoxide of benz(a)anthracene. In: Proceedings of the Social Experiments of Biological Medicine. Vol. 142, no. 1 (1972). p. 155-158

38. DiPaolo, J.A.; Casto, B.C. Chemical carcinogenesis. In: Gallo, R.C., ed. Recent advances in cancer research. Cleveland, Ohio : CRC Press, 1978. p. 17-47

39. Buick, R.N.; MacKillop, W.J. Measurement of self-renewal in culture of clonogenic cells from human ovarian carcinoma. British Journal of Cancer. Vol. 44, no. 3 (1981). p. 349-355

CCOHS/CCHST

40. Transformation in cell culture. In: Long-term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man). Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1980. Suppl. 2. p. 185-199

41. Purchase, I.F.H.; Longstaff, E.; Ashby, J.; Styles, J.A.; Anderson, D.; Lefevre, P.A.; Westwood, F.R. Evaluation of six short-term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use. Nature. Vol. 264, no. 5587 (1976). p. 624-627

42. Pienta, R.J.; Poiley, J.A.; Lebherz III, W.B. Further evaluation of a hamster embryo cell carcinogenesis bioassay. In: Cancer protection and detection. Vol. 2, Chapter 23. New York : Marcel Dekker, 1977

43. Toth, B.; Magee, P.N.; Shulik, P. Carcinogenesis study with dimethylnitrosamine administered orally to adult and subsutaneously to newborn BALB/c mice. Cancer Research. Vol. 24. (1964). p. 1712-1721

44. Peacock, P.M. A short-term test for carcinogenicity : the effects of certain closely related polycyclic aromatic hydrocarbons on embryo tissue homografts in BALB/c strain mice. British Journal of Cancer. Vol. 16 (1962). p. 701-706

45. Allison, A.C. Potentiation of viral carcinogenesis by immunosuppression. British Medical Journal. Vol. 4, no. 732 (1970). p. 419-420

46. Kalter, H. Correlation between teratogenic and mutagenic effects of chemicals in mammals. In: Hollaender, A., ed. Chemical mutagens: principles and methods for their detection. New York : Plenum Press, 1971. Vol. 1. p. 57-82

47. Stoltz, D.R.; Poirer, L.A.; Irving, C.L.; Stich, H.F.; Weisburger, J.H.; Grice, H.C. Evaluation of short-term tests for carcinogenicity. Toxicology and Applied Pharmacology. Vol. 29, no. 2 (1974). p. 157-180

48. Neubert, D. Teratogenicity : any relationship to carcinogenicity? In: Montesano, R.; Bartsch, H.; Tomatis, L., eds. Molecular and cellular aspects of carcinogen screening tests. (IARC Scientific Publication no. 27). Lyon : International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1980. p. 169-178

49. Svoboda, D.; Racela, A.; Higginson, J. Variations in ultrastructural nuclear changes in hepatocarcinogenesis. Biochemical Pharmacology. Vol. 16, no. 4 (1967). p. 651-657

50. Williams, D.J.; Rabin, B.R. Disruption by carcinogens of the hormone dependent association of membranes with polysomes. Nature. Vol. 232, no. 5306 (1971). p. 102-105

51. Reynolds, R.C.; Montgomery, P.O.B.; Hughes, B. Nucleolar "caps" produced by actinomycin D. Cancer Research. Vol. 24 (1964). p. 1269-1278

52. Bridges, B.A. Short-term screening tests for carcinogenicity. Nature. Vol. 261, no. 5557 (1976). p. 195-200

53. Bock, F.G.; Mund, R. A survey of compounds for activity in the suppression of mouse sebaceous glands. Cancer Research. Vol. 18 (1958). p. 887-892

54. Ashby, J.; Longstaff, E. Activity of 4 chloromethyl biphenyl in the mouse skin sebaceous gland suppression test. Mutation Research. Vol. 100, no. 1-4 (1982). p. 391-393

55. Iversen, O.H.; Evenson, A. Experimental skin carcinogenisis in mice. Acta Pathobiologica et Microbiologica Scandinavica. Suppl. no. 156 (1962). p. 11

56. McPherson, F.; Bridges, J.W.: Parke, D.V. In-vitro enhancement of hepatic microsomal biphenyl-2-hydroxylation by carcinogens. Nature. Vol. 252, no. 5483 (1974). p. 488-489

57. Szent-Gyorgyi, A.; Isenberg, I.; Baird, S. On the electron donating properties of carcinogens. Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 46 (1960). p. 1444

58. Szent-Gyorgyi, A.; McLaughlin, J. Reaction of carcinogens with acridine. Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 47 (1961). p. 1397

59. Purchase, I.F.H.; Longstaff, E.; Ashby, J.; Styles, J.A.; Anderson, D.; Lefevre, P.A.; Westwood, F.R. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. British Journal of Cancer. Vol. 37, no. 6 (1978). p. 873-895

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

60. Sugimura, T.; Sato, S.; Nagao, M.; Yahagi, T.; Matsushima, T.; Seino, Y.; Takeuchi, M.; Kawachi, T. Overlapping of carcinogens and mutagens. In: Magee, P.N.; Takayama, S.; Sugimura, T.; Matsushima, T., eds. Fundamentals in cancer prevention. Baltimore : University Park Press, 1976. p. 191-215

61. Zimmerman, F.K. Can we determine mutagenicity or only a mutagenic potential? Mutation Research. Vol. 92, no. 1-2 (1982). p. 3-7

62. Bennett, B.M. On comparisons of sensitivity, specificity and predictive value of a number of diagnostic procedures. Biometrics. Vol. 28, no. 3 (1972). p. 793-800

63. Lusted, L.B. Introduction to medical decision making. Springfield, Illinois : Charles C. Thomas, 1968

64. Choi, B.C.K. Index for rating predictive accuracy of screening tests. Methods for Information in Medicine. In press

65. Vecchio, T.J. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. New England Journal of Medicine. Vol. 274, no. 21 (1966). p. 1171-1173

66. Cooper, J.A.; Saracci, R.; Cole, P. Describing the validity of carcinogen screening tests. British Journal of Cancer. Vol. 39, no. 1 (1979). p. 87-89

67. Bartsch, H. Predictive value of mutagenicity tests in chemical carcinogensis. Mutation Research. Vol. 38, no. 3 (1976). p. 177-190

68. Bartsch, H.; Malaveille, C.; Camus, A.M.; Brun, G.; Hantefeuille, A. Validity of bacterial short-term tests for the detection of chemical carcinogens. In: Norpoth, K.H.; Garner, R.C., eds. Short-term mutagenicity test systems for detecting carcinogens. Berlin : Springer-Verlag, 1980. p. 58-73

69. McCann, J.; Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test : assay of 300 chemicals: discussion. In: Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 73, no. 3 (1976). p. 950-954

70. McCann, J.; Ames, B.N. The salmonella/microsome mutagenicity test : predicitive value for animal carcinogenicity. In: Hiatt, H.H., ed. Origins of human cancer. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1977. p. 1431-1450

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

71. Glatt, H.R.; Schwind, H.; Schechtman, L.M.; Beard, S.; Kouri, R.E.; Zajdela, F.;, Croisy, A.; Perin, F.; Jacquignon, P.C.; Oesch, F. Mutagenicity of closely related carcinogenic and non-carcinogenic compounds using various metabolizing systems and target cells. In: Norpoth, K.H.; Garner, R.C., eds. Short-term mutagenicity test systems for detecting carcinogens. Berlin : Springer-Verlag, 1980. p. 103-126

72. Odashima, S. The cooperative development in Japan of methods for screening chemicals for carcinogenicity. In: Montesano, R.; Bartsch, H.; Tomatis, T., eds. (IARC Scientific Publicaton no. 12) Screening tests in chemical carcinogenesis. Lyon : International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1976. p. 61-75

73. Poirier, L.A. Mutagenicity screening tests for carcinogenicity. In: Montesano, R., eds. (IARC Scientific Publication no. 12). Screening tests in chemical carcinogensis. Lyon : International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1976

74. Bartsch, H.; Malaveille, C.; Camus, A.M.; Martel-Planche, G.; Brun, G.; Hantefeuille, A.; Sabadie, N.; Barbin, A.; Kuroki, T.; Drevon, C.; Piccoli, C.; Montesano, R. Validation and comparative studies on 180 chemicals with Salmonella typhimurium strains and V-79 Chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. Mutation Research. Vol. 76, no. 1 (1980). p. 1-50

75. Jenssen, D.; Ramel, C. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. Mutation Research. Vol. 75, no. 2 (1980). p. 191-201

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est.
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

L'UTILITE DES TESTS A COURT TERME POUR LA RECHERCHE DES AGENTS CANCEROGENES: UNE REVUE TECHNIQUE

PAR

BERNARD C.K. CHOI
DEPARTEMENT DE MEDECINE PREVENTIVE ET DE BIOSTATISTIQUES
UNIVERSITE DE TORONTO
NOVEMBRE 1982

PREPAREE POUR

LE CENTRE CANADIEN D'HYGIENE ET DE SECURITE AU TRAVAIL

Canadian Centre for Occupational Health and Safety

Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail

P83-4F

L'UTILITE DES TESTS A COURT TERME POUR LA RECHERCHE DES AGENTS CANCEROGENES: UNE REVUE TECHNIQUE

NUMERO DU CCHST P83-4F

NUMERO ISBN 0-660-91268-6

NUMERO DE CATALOGUE DSS CC273-2/83-4F

Cette publication est offerte
dans les deux langues officielles.

This publication is available
in both official languages.

Le Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail s'efforce de s'assurer que l'information qu'il distribue est exacte et exhaustive. Cependant il est entendu que le Centre ne se porte pas garant que ladite information est exacte et exhaustive et ne sera tenu responsable d'aucun dommage ni d'aucune perte subis par le demandeur par suite de l'utilisation d'une information inexacte ou incomplète.

Date de publication: 1983

Exemplaires supplémentaires disponibles sur demande.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

21ième réunion du
Comité de publication
1983 12 06
Agenda Item #5C
Document 1047t
Réf doc 210X
Ebauche 1983 11 15
1984 03 27

RESUME

Le nombre de substances chimiques en usage dans l'industrie a considérablement augmenté au cours des dernières décennies. Il est possible que certains de ces agents soient cancérogènes, c'est pourquoi il importe de les reconnaître et de les éliminer si l'on veut prévenir le cancer chez les humains. Ces agents cancérogènes peuvent être dépistés au moyen de tests à court terme rapides, peu coûteux et fiables. Les tests peuvent également servir à établir un ordre de priorité quant aux mesures de contrôle et aux tests additionnels requis.

Ces tests à court terme permettent de déceler toute une gamme de changements biologiques et biochimiques associés à l'action des substances cancérogènes. Plus de 100 de ces tests peuvent être utilisés pour la recherche des cancérogènes. Certains sont utilisés couramment, notamment le test de Ames qui est basé sur l'étude de mutants de bactéries Salmonella et certains autres tests effectués sur des cellules de type mammalien (mutation, aberration chromosomique, synthèse de réparation de l'ADN, échange de chromatides soeurs, épreuve micronucléolaire et transformation cellulaire).

Ces tests sont généralement effectués sur des cellules isolées qui ne deviennent pas effectivement cancéreuses. C'est pourquoi il faut être prudent lorsqu'on extrapole les résultats à l'homme. Les notions statistiques de spécificité, de sensibilité et de valeur prédictive sont utilisées pour faciliter cette interprétation. A cause des lacunes inhérentes à ces tests et de la faible proportion de substances chimiques qu'on estime être cancérogènes, on peut s'attendre à ce qu'un grand nombre des produits pour lesquels les résultats de tests à court terme ont été positifs ne soient pas en fait cancérogènes. Par contre, presque tous les produits chimiques qui se sont révélés négatifs aux tests à court terme ne sont probablement pas cancérogènes. Les tests à court-terme ne peuvent actuellement remplacer les tests de longue durée sur des animaux et servent probablement

CCOHS/CCHST
250 Main Street East/250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

surtout à l'étude des produits chimiques avant les essais sur les animaux. Pour déterminer avec plus d'exactitude le pouvoir cancérogène d'un agent, il faudra faire des recherches additionnelles afin de valider quelques tests à court terme qui s'avèrent prometteurs et pour combiner statistiquement les résultats de ces tests.

INTRODUCTION

"Nous vivons dans une mer de produits chimiques dont les pouvoirs mutagène et cancérogène n'ont pas été établis (1)". Cette mer de produits chimiques est en grande partie due à l'importante capacité de l'industrie moderne de fabriquer des produits de synthèse. En 1977, le registre informatisé de l'American Chemical Society comprenait plus de quatre millions de substances chimiques distinctes et ce nombre augmente en moyenne de 6,000 par semaine (2). De toutes ces substances, 6,000 seulement ont fait l'objet de tests visant à établir leur pouvoir cancérogène; d'après les résultats obtenus, environ 1,000 sont effectivement cancérogènes (3). Les produits qui faisaient partie de ce premier groupe étudié avaient été choisis parce qu'on les soupçonnait sérieusement d'être cancérogènes, et il semble bien que seul un faible pourcentage de l'ensemble des produits chimiques le seront effectivement. Néanmoins, il semble évident qu'un grand nombre d'autres produits chimiques seront ajoutés à la liste de ceux qu'on juge susceptibles d'engendrer ou de favoriser le développement du cancer chez l'homme (4).

On ne peut évaluer directement la cancérogénicité de produits chimiques pour l'homme qu'en étudiant des cas de cancer et en les reliant à une exposition à ces produits. Les autres méthodes, notamment les essais sur animaux en laboratoire et les tests à court terme sont, au mieux, des mesures indirectes des risques que présentent ces produits pour les humains.

L'épidémiologie est l'étude des caractéristiques de la morbidité et de la mortalité chez les humains et des facteurs qui déterminent leur répartition. Cette étude est généralement effectuée à postériori, c'est-à-dire qu'on établit, après le fait, l'incidence ou la prévalence d'un cancer donné chez un groupe de sujets qui ont été exposés à un certain produit chimique. Cette incidence ou cette prévalence "observée" est ensuite comparée à la valeur probable ou moyenne pour ce genre de cancer dans la population témoin (généralement composée d'un groupe apparié de travailleurs non exposés aux produits chimiques étudiés) (5). Parmi les agents cancérogènes ainsi

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

détectés, on note la naphtylamine-2 (cancer de la vessie) (6) et l'amiante (cancer du poumon) (7).

Les études épidémiologiques sont très coûteuses et très longues. De plus, à cause des modes d'exposition complexes qu'on retrouve dans les lieux de travail et des problèmes associés à l'enregistrement des données ou au rappel, il est souvent difficile d'établir avec certitude qu'un produit chimique donné est cancérogène. C'est pourquoi l'épidémiologie permet généralement de découvrir des endroits à risque élevé ou confirme les risques soupçonnés. Cette science ne permet généralement pas de préciser les dangers de cancer associés à un produit chimique donné (8).

Les études sur des animaux constituent une autre façon d'évaluer et de prévoir la cancérogénicité de certains produits pour les humains. La supériorité de ces études vient du fait que la plupart des substances qui sont cancérogènes pour les humains le sont également pour les animaux de laboratoire, qu'on peut administrer à ces animaux des doses connues de produits chimiques et que les cancers se développent plus rapidement chez les petits animaux comme les souris et les rats que chez les humains.

Les tests sur les animaux se font par administration à des animaux de laboratoire (généralement des rongeurs) de doses élevées, mais non violemment toxiques, d'une substance chimique suspecte par une voie appropriée (voie orale, inhalation, implantation ou badigeonnage). On garde ces animaux en observation pendant presque toute la durée de leur vie (un à deux ans généralement) et on les examine avec soin afin de détecter la formation de tumeurs.

Les tests sur les animaux présentent cependant certains inconvénients. Tout d'abord, ils exigent beaucoup de temps et coûtent cher: un test portant sur l'administration de deux doses différentes d'un seul produit chimique à deux espèces animales différentes peut exiger jusqu'à 3 ans et coûter 500,000 $ US (9). Deuxièmement, en raison du coût de ces expériences, on n'examine qu'un nombre relativement faible d'animaux (habituellement 300 ou moins), ce qui limite la sensibilité des épreuves et empêche le dépistage des substances faiblement cancérogènes. Troisièmement, les animaux de laboratoire ne sont pas des êtres humains en miniature et ne réagissent pas nécessairement comme l'homme à un produit chimique donné (10). C'est pour ces raisons, entre autres, que les résultats des expériences sur animaux en laboratoire doivent être interprétés avec soin et que l'extrapolation doit être faite avec prudence.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

LES TESTS A COURT TERME

Au cours des dernières années, on a mis au point un certain nombre de tests à court terme qui permettent rapidement et à peu de frais de détecter les substances susceptibles d'être cancérogènes. Ces tests qui utilisent un grand nombre de cellules, de tissus et de procédés chimiques permettent de détecter les changements associés au développement du cancer. Comme les principaux stades de la cancérogenèse sont encore mal connus, les tests à court terme sont fondés sur des corrélations entre l'action des substances étudiées et l'action d'agents cancérogènes connus dans les mêmes tests. Ce genre de tests est encore plus "loin" de l'homme que les épreuves sur animaux de laboratoire; c'est pourquoi ils doivent être interprétés avec encore plus de prudence. Malgré cela, ils sont largement utilisés comme épreuve générale de dépistage des agents cancérogènes.

Les tests à court terme peuvent être classés en douze groupes différents selon le genre de changements à détecter. Ce sont:

1. **Les tests de mutagenèse.** Ces tests sont fondés sur la forte corrélation qui existe entre l'activité cancérogène (capacité d'engendrer ou de favoriser le développement du cancer) et l'activité mutagène (capacité de provoquer une mutation) des agents chimiques. Les mutations sont des modifications héréditaires permanentes de la structure du constituant génétique qu'est l'ADN: selon des données concluantes, certaines mutations particulières sont parmi les premières activités qui marquent le développement du cancer (11).

Le test de Ames (1), un test de mutagenèse basé sur l'étude de Salmonella Typhi murium/microsomes de mammifères, est le test à court terme le plus couramment utilisé à l'heure actuelle: les résultats de l'étude de plus de 12,000 produits chimiques ont déjà été publiés (12). Nous décrirons ce test de façon assez détaillée afin d'illustrer les particularités des tests à court terme.

On a produit tout d'abord une série de souches de Salmonella Typhi murium. Ces souches ont subi différentes mutations, mais dans tous les cas elles sont incapables de se développer en l'absence d'histidine. Si le traitement de la bactérie avec un agent cancérogène inverse la mutation choisie, les bactéries peuvent alors fabriquer leur propre histidine et se multiplier de manière à former une "colonie" facile à détecter. On calcule les mutations

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

en comptant le nombre de colonies. Mais si la substance est suffisamment toxique pour tuer les bactéries, il n'y aura pas de formation de colonies et il sera peut-être impossible d'établir la mutagénicité.

Les souches utilisées au cours des tests peuvent servir à détecter différents types d'agents mutagènes (TA1537, TA1538, TA97 et TA98 pour les mutagènes qui provoquent des différences dans le cadre de lecture et TA1535 et TA100 pour les mutagènes qui provoquent la substitution de nucléotides) (13, 14). Il se peut que seules certaines souches réagissent à un agent mutagène donné (présumé cancérogène). Au cours d'un seul test, on peut utiliser de une à six souches de S. Typhi murium. La précision du test augmente avec le nombre de souches utilisées; il en est de même pour le coût.

Les souches utilisées pour le test ont subi d'autres changements qui les rendent plus sensibles aux agents mutagènes. Certaines souches contiennent une mutation (gène uvrB), ce qui les rend déficientes en enzymes de réparations de l'ADN (13). La perméabilité de la membrane cellulaire des souches de Salmonella aux substances chimiques a été accrue par un mutant rugueux (deep rough rfa) (15). Enfin, une autre série de souches contient le plasmide de résistance aux médicaments, pKM 101 (16).

Un des développements les plus importants dans le domaine des tests à court terme a été l'introduction d'un extrait hépatique ("microsomes" ou "S-9"), provenant généralement de rats et contenant des enzymes capables d'activer un grand nombre d'agents cancérogènes. On désigne communément ce procédé par le nom d'activation métabolique. Cet extrait hépatique a grandement amélioré les taux de succès du test (17) et est utilisé dans un grand nombre d'autres tests à court terme. Grâce à tous ces efforts, le test de Ames permet de détecter des substances mutagènes présentes en infimes quantités, généralement des microgrammes (10^{-6} grammes), et dans certains cas, même des nanogrammes (10^{-9} grammes).

Les résultats obtenus au test de Ames dans un grand nombre de laboratoires et pendant de nombreuses années ont mis en évidence une impressionnante corrélation entre le pouvoir mutagène et le pouvoir cancérogène. Il permet de déceler la plupart des agents chimiques <u>organiques</u> reconnus cancérogènes pour l'homme, sauf le benzène et le diethylstilboestrol (18). La plupart des produits chimiques qui se sont révélés cancérogènes au cours d'épreuves sur des animaux d'expérience ont également un pouvoir mutagène qui peut être détecté grâce au test de

CCOHS/CCHST
250 Main Street E/250 rue Main est
Hamilton, Ontario Canada L8N 1H6

Ames (19). De la même manière, les souches n'ont pas permis de déceler une activité mutagène pour la plupart des agents chimiques qui s'étaient révélés non cancérogènes au cours des tests sur les animaux de laboratoire. Le grand défaut du test est son incapacité de détecter des changements produits par certains métaux cancérogènes dont plusieurs sont cancérogènes pour l'homme.

On a mis au point d'autres tests de mutagenèse basés sur l'étude d'autres souches bactériennes, notamment Escherichia coli (20) et B. subtilis (21) et de cellules de mammifères, notamment des fibroblastes humains, des cellules de souris et des cellules de hamster chinois (22, 23). Les cellules de type mammalien ont l'avantage possible d'être semblables aux cellules humaines normales, notamment en ce qui concerne la structure chromosomique ainsi que le transport et le métabolisme des agents chimiques. Ces tests ne sont toutefois pas aussi sensibles que prévu et sont parfois beaucoup plus difficiles à réaliser. Dans la pratique, le test de Ames est utilisé presque universellement dans les programmes de détection de la cancérogénicité, tandis que les autres tests de mutagenèse servent surtout à en confirmer ou à en étoffer les résultats.

2. **Tests fondés sur les aberrations chromosomiques.** Les chromosomes sont des éléments du noyau cellulaire visibles au microscope sous forme de bâtonnets. Ils sont composés de longues molécules d'ADN qui portent l'information génétique. La plupart des agents cancérogènes causent des aberrations chromosomiques (cassures visibles ou autres dommages); il existe également un lien étroit entre les aberrations chromosomiques et le développement du cancer (24). Ce sont là les éléments qui constituent la base des tests à court terme utilisés pour l'étude des aberrations chromosomiques dans les cellules de mammifères (11, 24, 25, 26). Les lymphocytes (type de globule blanc provenant de l'homme ou d'un animal de laboratoire) sont couramment employés pour évaluer les effets des produits chimiques sur les chromosomes, mais il arrive souvent qu'on utilise des cellules de mammifères en culture et des spermatogonies de souris. Le principal avantage de ce test est qu'il peut être fait sur des cellules provenant d'êtres humains ou d'animaux exposés (exposition in vivo). Les résultats concordent assez bien avec ceux du test de Ames et des épreuves sur les animaux (24), mais il semble que la fréquence des faux positifs soit un peu plus élevée: certains produits chimiques (apparemment) non cancérogènes et d'autres facteurs, notamment les infections à virus, peuvent accroître la fréquence des aberrations.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario Canada L8N 1H6

3. **Les tests fondés sur les échanges entre chromatides soeurs.** Les chromatides soeurs sont les deux parties identiques d'un chromosome dans une cellule en cours de division. Les échanges entre chromatides soeurs sont des échanges d'ADN entre les deux chromatides. On croit que ces échanges se produisent au cours du processus de réparation de l'ADN et le nombre d'échanges entre chromatides soeurs permet de mesurer le dommage subi par l'ADN. Ils sont facilement visibles dans les chromosomes d'un grand nombre de cellules de mammifères (26, 27, 28). La technique des échanges entre chromatides soeurs est relativement facile à exécuter et à analyser et l'on peut utiliser des lymphocytes (globules blancs) provenant d'êtres humains exposés à certains agents cancérogènes ainsi que des sparmatogonies ou des cellules de moelle osseuse provenant d'un animal de laboratoire à qui l'on a administré l'agent cancérogène étudié. Comme ces tests sont très sensibles à certains agents cancérogènes et beaucoup moins à d'autres (29), ils ne peuvent pas encore être acceptés comme des indicateurs quantitatifs des risques de cancer.

4. **Les tests fondés sur la formation de nucléoles.** Les nucléoles sont des fragments de chromosomes qui se trouvent dans la cellule, mais hors du noyau. Ils proviennent d'une rupture chromosomique (ADN) ou d'un dérèglement de la division cellulaire (30, 31). On peut voir des nucléoles dans le sang et les cellules de moelle osseuse des animaux qui ont été exposés à certains cancérogènes. L'efficacité de ces tests pour la détection des agents cancérogènes et non cancérogènes est cependant inférieure à celle du test de Ames.

5. **Les tests fondés sur la réparation de l'ADN.** Les dommages chimiques subis par l'ADN sont réparés par l'action d'un système d'enzymes. La mesure de cette réparation permet d'évaluer la capacité qu'a un agent chimique d'endommager l'ADN. La synthèse d'ADN qui se produit au cours de la reconstitution est généralement mesurée par la fixation d'un marqueur radioactif au cours de la période qui suit immédiatement l'exposition à l'agent chimique étudié (32, 22). Il existe à l'heure actuelle plusieurs tests fondés sur la réparation de l'ADN qui se font à l'aide de cellules de bactéries, de levures et de mammifères, notamment de cellules humaines (34). Ces tests détectent certains effets des agents chimiques qui ne peuvent être mis en évidence au cours des épreuves de mutagenèse. Ils sont donc complémentaires aux tests de mutagenèse et sont souvent associés à ces derniers dans des batteries de tests à court terme. Un grand désavantage des tests fondés sur la réparation de l'ADN

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

est qu'ils mesurent également les dommages qui ne sont pas associés à la cancérogénèse.

6. **Les tests fondés sur la survie des cellules.** Les cellules déficientes quant à la réparation d'ADN sont plus facilement tuées que les bactéries normales (du type sauvage) par les agents qui peuvent provoquer des lésions à l'ADN. Cette différence fournit une méthode simple pour détecter les lésions de l'ADN; il s'agit en effet de mesurer le taux de survie de cellules ayant différentes capacités de reconstitution de l'ADN. Des souches bactériennes déficientes quant à leur pouvoir d'excision (35) ou de recombinaison (36) et des cellules humaines de Xeroderma pigmentosum déficientes quant à leur pouvoir de réparation (37) ont été utilisées. Jusqu'à ce jour, cette méthode a davantage servi à la recherche qu'au dépistage.

7. **Les tests fondés sur la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses.** Certaines cellules de mammifères cultivées peuvent être transformées en cellules cancéreuses par un traitement avec des cancérogènes: ces cellules cancéreuses provoqueront le développement de tumeurs lorsqu'elles seront injectées à certains animaux choisis. Les cellules ainsi transformées acquièrent d'autres propriétés qui peuvent servir d'indicateurs dans les tests à court terme (38, 39, 40). Le plus courant de ces indicateurs est la capacité de ces cellules de former des colonies semblables à celles qui caractérisent les cellules cancéreuses. Deux études ont montré que la capacité de ces tests de prédire le pouvoir cancérogène est comparable à celle des tests de mutagenèse faits sur des bactéries (41, 42). Certains problèmes associés à ces tests en limitent actuellement l'usage; ce sont les taux élevés de transformation cellulaire "spontanée", la difficulté de définir des critères permettant d'établir une corrélation entre les transformations cellulaires obtenues in vitro et le cancer et enfin, la compétence technique requise pour réaliser ces tests.

8. **Les tests fondés sur la formation accélérée de tumeur.** Afin de réduire le temps requis pour les tests sur les agents cancérogènes, des chercheurs ont proposé diverses méthodes pour accélérer le développement des tumeurs. Parmi ces méthodes mentionnons l'utilisation d'animaux nouveau-nés (43), l'implantation d'agents cancérogènes et de tissus embryonnaires à des animaux adultes (44) et l'immunosuppression (45). Cependant, ces tests accélérés exigent encore plusieurs mois ou plus, et parfois l'accélération désirée ne se produit pas.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

9. **Les tests de tératogenèse.** De nombreux agents cancérogènes sont également tératogènes (c'est-à-dire qu'ils peuvent provoquer des malformations congénitales), et la tératogenèse a été suggérée comme indicateur d'une action cancérogène possible (46). Divers cancérogènes, notamment les dérivés de l'uréthane et du benzanthracène, ont produit des changements tératogènes chez les petits des rongeurs femelles à qui ils avaient été administrés (47). Selon les études faites jusqu'à ce jour, il n'existe pas une grande corrélation entre la tératogénicité et le pouvoir cancérogène (46, 48).

10. **Les tests fondés sur les modifications cytologiques.** Les agents cancérogènes ont le pouvoir de modifier la structure et la morphologie de certaines cellules, et ces changements peuvent servir au dépistage. Parmi ces modifications cytologiques, notons les transformations des nucléoles (49) et la dégranulation des microsomes (test de Rabin) (50). Par exemple, la taille des nucléoles s'accroît sous l'effet du thio-acétamide, mais diminue sous l'effet de l'orangé d'acridine et de l'actinomycine D (51). Le test de Rabin a décelé avec succès la cancérogénicité des amines aromatiques, mais a été incapable de le faire pour d'autres produits chimiques (52). Ces tests n'ont pas fait l'objet d'un effort intensif de validation.

11. **Les tests fondés sur les changements biologiques.** Ces tests portent sur les changements qui surviennent dans la croissance ou la morphologie de certains tissus après une exposition à des agents cancérogènes. Ils comprennent le test des glandes sébacées (53, 54) et le test de l'implant (41). Ces tests n'ont pas été étudiés à fond et semblent surtout utilisés conjointement avec des expériences sur les animaux en laboratoire. Il peuvent aussi être utiles comme éléments d'une batterie de tests.

12. **Les tests fondés sur les réactions biochimiques.** On sait qu'un certain nombre de réactions chimiques sont caractéristiques de certaines classes de cancérogènes chimiques. Ces réactions comprennent le test de réduction du tétrazolium (55), le test au biphényle (56) le dosage à l'iode (57) et le dosage à l'acridine (58). Comme ces tests sont spécifiques à certains agents cancérogènes, ils ne peuvent pas être utilisés couramment dans les programmes de recherche généraux (41).

Ce bref survol nous a permis de constater qu'il existe de nombreux tests à court terme pour la recherche des cancérogènes. De fait, Hollstein et McCann (18) en ont

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario Canada L8N 1H6

dénombré plus de 100. De tous ceux-ci, c'est le test de Ames qui est de loin le plus populaire et qui est utilisé couramment dans de nombreux laboratoires. Parmi les autres tests communément employés, notons les tests fondés sur la mutation des cellules de type mammalien, sur les aberrations chromosomiques, sur la synthèse de réparation de l'ADN, sur les échanges entre chromatides soeurs, sur la formation de micronucléus et sur la transformation cellulaire.

La plupart des tests à court terme qui sont largement utilisés à l'heure actuelle pour la recherche de substances cancérogènes sont des épreuves de détermination du pouvoir mutagène des agents chimiques ou de leur capacité de causer des lésions à l'ADN (11). On a démontré qu'il existe effectivement une bonne corrélation entre les agents chimiques cancérogènes et les agents chimiques mutagènes (16, 59, 60); cette corrélation porte à croire qu'une même activité moléculaire marque les deux processus. Les tests à court terme ne peuvent toutefois simuler qu'une petite partie de l'ensemble des mécanismes complexes de la cancérogénèse (61). Voilà pourquoi il faut interpréter leurs résultats avec prudence si l'on veut les appliquer à la cancérogénèse.

LA VALIDITE DES TESTS A COURT TERME

Voici quelques définitions qui aideront à mieux comprendre le rôle des tests à court terme dans la recherche sur la cancérogénicité des substances chimiques:

La VALIDITE d'un test est l'exactitude avec laquelle il mesure ce qu'il a pour objet de mesurer. Un test de cancérogénicité devrait permettre d'emblée de distinguer les agents chimiques cancérogènes de ceux qui ne le sont pas. Cette caractéristique du test est appelée validité. La validité recouvre deux concepts: la sensibilité et la spécificité. On entend par SENSIBILITE, l'aptitude d'un test à indiquer correctement quelles sont les substances qui causent le cancer (62, 63). Quant à la SPECIFICITE d'un test, c'est de son aptitude à indiquer correctement quels sont les agents qui ne provoquent pas le cancer.

Etant donné que les tests à court terme n'ont pas pour but la production de tumeurs chez les animaux, ils doivent être validés à l'aide de substances cancérogènes et non cancérogènes connues. En déterminant dans quelle mesure les résultats du test de dépistage concordent avec ceux qui ressortent des études sur l'être humain et des tests sur les animaux, on obtient une idée de la sensibilité et

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

de la spécificité du test. Idéalement, le test de dépistage devrait avoir une sensibilité et une spécificité de 100 pour cent. Dans la pratique, cela ne se produit pas ainsi: la sensibilité est généralement inversement proportionnelle à la spécificité, et vice versa, c'est-à-dire qu'on obtient généralement une forte sensibilité au prix d'une faible spécificité.

Nombre d'études ont été menées pour établir dans quelle mesure les tests à court terme réussissent à détecter les substances cancérogènes et non cancérogènes (tableau p. 18). Le test d'Ames (Salmonella) est, de tous les tests à court terme, celui qui a été le mieux étudié et qui est le plus solidement validé, et peut constituer un exemple de l'application de concepts statistiques. Jusqu'ici, l'étude de validation la plus vaste jamais faite du test d'Ames a été réalisée par McCann et ses collègues qui ont appliqué le test à environ 300 agents chimiques (19). Des 175 substances cancérogènes testées, 157 (90%) ont donné des résultats positifs tandis que dans le cas de 108 agents non cancérogènes, les résultats ont été négatifs dans 87% des cas (94/108).

Dans cette étude, le niveau de dépistage a été fixé à 0.01 révertant par nanomole (nmol, 10^{-9} mole), c'est-à-dire que tout résultat supérieur à ce seuil a été jugé positif. On a ainsi obtenu une sensibilité de 90% et une spécificité de 87%. Si l'on avait choisi un seuil plus élevé, mettons 0.1 révertant par nanomole (ce qui équivaudrait à traiter tous les mutagènes faibles comme des non-mutagènes), la sensibilité aurait été de 81% (141/175) et la spécificité de 90% (97/108).

Lorsque les substances cancérogènes donnent un résultat négatif, on qualifiera ce résultat de faux négatif, de même lorsque les substances non cancérogènes donnent un résultat positif, on dira qu'il s'agit d'un résultat faux positif. Il va de soi qu'un test sensible donnera quelques résultats faux négatifs et qu'un test spécifique produira quelques résultats faux positifs.

Un élément important des tests de cancérogénicité est leur capacité de prédire la cancérogénécité (64). La sensibilité et la spécificité sont des mesures de l'aptitude d'un test à <u>reconnaître</u> correctement les substances cancérogènes et non cancérogènes, mais il ne s'agit pas de mesures de l'aptitude d'un test à <u>prédire</u> la cancérogénicité ou la non-cancérogénicité. Lors de sa première évaluation, le test est appliqué à un groupe d'agents cancérogènes et non cancérogènes, et les indices de sensibilité et de spécificité sont calculés. Si les

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

résultats semblent assez encourageants, le test peut être admis au nombre des pratiques de laboratoire courantes.

Alors que les premiers enquêteurs se penchent d'abord sur un groupe de substances dont le caractère cancérogène avait déjà été confirmé, ceux qui utilisent le test par la suite s'intéressent à des substances dont les propriétés cancérogènes sont inconnues. L'objet du test est de prédire si la substance peut être cancérogène ou pas. Au moment où les résultats du test sont connus, l'enquêteur veut donc savoir quelle est sa capacité de prédire et non pas sa sensibilité ou sa spécificité. Si le résultat du test est positif, quelle est la probabilité que la substance soit cancérogène? S'il est négatif, quelle est la probabilité qu'elle soit non cancérogène? Pour répondre à ces deux questions, il y a lieu de définir un autre ensemble d'indices qu'on appelle les valeurs prédictives.

D'après les définitions qui en sont données (62, 65), LA VALEUR PREDICTIVE D'UN TEST POSITIF (VP+) indique la probabilité qu'une substance pour laquelle on a obtenu un résultat positif soit cancérogène. On l'évalue d'après la proportion de carcinogènes parmi les substances pour lesquelles les résultats du test sont positifs. LA VALEUR PREDICTIVE D'UN TEST NEGATIF (VP-) indique la probabilité qu'une substance pour laquelle on a obtenu un résultat négatif soit non cancérogène. On l'évalue d'après la proportion de non cancérogène parmi les substances pour lesquelles les résultats du test sont négatifs.

Toujours selon l'étude de validation de McCann et ses collègues (1975b), le test d'Ames a les propriétés suivantes:

Sensibilité	= 90% (157/175)
Spécificité	= 87% (94/108)
Taux de faux positifs	= 13% (14/108)
Taux de faux négatifs	= 10% (18/175)
VP+	= 92% (157/(157+14))
VP-	= 84% (94/(94+18))
Proportion de cancérogènes	= 62% (175/(175+108))

Dans cette étude de validation, le groupe de substances testées comprend 62% de cancérogènes et 38% de non-cancérogènes. Dans les faits, toutefois, la proportion de cancérogènes (ou la probabilité qu'une substance testée, choisie au hasard, soit cancérogène) risque d'être bien plus faible et variera selon la catégorie de substances chimiques à laquelle appartient le produit testé. Si l'étude de validation avait été

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

appliquée à un groupe de substances qui comptait une proportion de cancérogènes de 1%, la sensibilité et la spécificité étant identiques, la VP+ aurait chuté à 6.5% alors que la VP- aurait atteint 99.9%. Il serait très décevant d'apprendre que pour une substance à l'égard de laquelle le test d'Ames a donné un résultat positif, la probabilité qu'il s'agisse d'un cancérogène n'est que de 6.5%. (59, 66, 67, 68). La faible valeur VP+ s'explique par le nombre important de non-cancérogènes (dans ce cas 99%) qui donnent lieu à un grand nombre de faux positifs en dépit du faible taux de faux positifs. Si l'on évalue à 10% la proportion de cancérogènes dans l'exemple qui nous intéresse, la valeur VP+ s'élève à 43% environ alors que la valeur VP- diminue légèrement, s'établissant à 98.7%.

ORIGINE DES RESULTATS FAUX POSITIFS ET FAUX NEGATIFS

Il y a peu de chances qu'un test à court terme puisse être amélioré au point d'avoir une sensibilité et une spécificité de 100%. Sans doute y aura-t-il toujours une proportion quelconque de résultats faux positifs et faux négatifs. D'où cela provient-il? Si l'on prend l'exemple du test d'Ames, les résultats faux positifs et faux négatifs peuvent provenir de plusieurs sources (10, 52, 69, 70, 71):

Faux positifs. Dans le test d'Ames, les résultats faux positifs peuvent être attribués aux facteurs suivants:

1. Des lacunes inhérentes aux tests de cancérogénèse sur les animaux. Par exemple l'additif alimentaire connu sous le nom de furylfuramide a donné des résultats négatifs dans deux tests sur animaux, mais on finit par se rendre compte qu'il avait un faible pouvoir cancérogène: le "non-cancérogène" était en réalité cancérogène. D'autres composés tels que l'azide de sodium peuvent donner des résultats équivoques dans les tests sur des animaux. Si un vrai cancérogène est considéré comme non cancérogène par suite d'un test sur animaux, le résultat positif donné par un test à court terme sera considéré comme étant un faux positif.

2. L'action exercée par certaines bactéries sur les substances chimiques. Ainsi, les composés azotés sont convertis en mutagènes par la présence de nitro-réductases dans les bactéries. Ces enzymes ne se retrouvent pas couramment dans les cellules mammaliennes, et les animaux traités ne seraient pas susceptibles d'avoir des tumeurs.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

3. La sursensibilité de certaines souches utilisées pour les tests, attribuable à des déficiences du mécanisme de réparation. Par exemple, il pourrait y avoir réversion à la suite d'une exposition aléatoire à des rayons ultraviolets, d'où des résultats faux positifs.

4. Les impuretés mutagènes - Ainsi, on a montré que des échantillons de 5 hydroxy-2 acétylaminofluorène possédaient des propriétés mutagènes en raison de la présence d'une impureté. C'est pourquoi il est important de tester le composé pur, le composé technique et les impuretés courantes.

5. Les composés qui favorisent la croissance cellulaire dans les épreuves. Ces composés peuvent accroître la possibilité de mutations spontanées (résultats faux positifs).

Faux negatifs. Les substances cancérogènes peuvent donner des résultats négatifs au test d'Ames pour les raisons suivantes:

1. Des déficiences du système d'activation métabolique in vitro. Si la substance est en contact prolongé avec la préparation de cellules hépatiques, les chances d'activation s'en trouvent accrues. Par exemple, la mutagénicité de la diméthynitrosamine peut être détectée par une pré-incubation avec des enzymes à fortes concentrations. En outre, l'extrait hépatique isolé peut être un modèle inadéquat pour l'étude de l'activité biochimique complexe que supposent la détoxication et l'activation des agents cancérogènes dans l'organisme intact. Ainsi, la cycasine, substance naturelle est convertie en methylazoxy-méthanol (qui est cancérogène) par la présence de micro-organismes dans l'intestin et non pas par le foie.

2. La toxicité du composé pour les bactéries peut masquer l'effet mutagène. Certains composés peuvent être bien plus toxiques pour les bactéries que pour les animaux. Par exemple, certains pesticides chlorés peuvent être reconnus comme mutagènes à quelques rares concentrations, juste au-dessous de la dose à laquelle ils tuent les bactéries.

3. L'absence de souches sensibles aux effets mutagènes en question. Par exemple, la nouvelle souche TA94 peut détecter le mitomycin C et le malondialdehyde, qui ne peuvent être détectés par les autres souches.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

4. Les mutagènes qui sont propres aux cellules animales et ne peuvent être détectés à l'aide de tests effectués avec des bactéries. Un exemple est le griseofulvin qui nuit à la formation de microtubules. Comme les cellules bactériennes sont dépourvues de microtubules, le griseofulvin n'agit pas sur les bactéries.

5. Les cancérogènes qui agissent autrement que par mutation somatique. Par exemple, les hormones peuvent provoquer le cancer chez les animaux par leur action sur la croissance cellulaire.

6. Les réactions chimiques et les effets du pH dans l'épreuve sur plaque. Ainsi, certains agents chimiques peuvent être mutagènes uniquement dans certaines conditions spéciales qui ne sont pas reproduites dans l'épreuve type. Par exemple, il peut être difficile de tester des substances chimiques qui réagissent avec des composés chimiques du système testé, qui forment des composés insolubles ou qui sont inactifs au pH utilisé dans l'épreuve. Si l'on prévoit ce genre de problèmes, il peut s'avérer nécessaire de modifier le test.

Aucun test n'est parfait, et tous les tests ont un plafond pour ce qui est du degré d'exactitude qu'ils peuvent atteindre. Mettre au point un test, trouver qu'il est imparfait, l'abandonner pour essayer d'en concevoir un autre: voilà une solution qui n'est pas toujours pratique et rentable.

Il existe deux possibilités à ce stade-ci. Tout d'abord, les tests à court terme relativement plus exacts qui existent déjà peuvent être améliorés, normalisés et plus solidement validés de manière que les coefficients d'exactitude soient mieux évalués. Jusqu'ici, d'après diverses études de validation, la sensibilité du test d'Ames varie de 63% à 95% (tableau p. 18), ce qui est de toute évidence insuffisant. Deuxièmement, un certain nombre de tests de dépistage, mettons 5, peuvent être regroupés en une batterie de tests qui remplaceraient le test unique. Voilà qui est particulièrement important si l'on considère que les modes d'action des cancérogènes peuvent être nombreux et que l'on pourrait avoir besoin d'une batterie de tests pour détecter ces différents effets. Ainsi, des résultats positifs dans 3 tests et négatifs dans 2 autres tests sont plus révélateurs qu'un résultat négatif ou positif dans un seul test. On envisage actuellement de recourir à des méthodes statistiques pour réunir les résultats de divers tests à court terme.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est.
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

Au stade où en sont actuellement les tests de cancérogénèse, il apparaît qu'aucun test ou aucune batterie de tests ne puisse remplacer les expériences de longue durée sur des animaux lorsqu'il s'agit de déterminer le pouvoir cancérogène d'une substance. Ces tests servent essentiellement à faire un tri préliminaire des substances qui peuvent être soumises en priorité à des recherches de l'activité biologique des animaux de laboratoire.

Rares sont ceux qui s'opposeraient à la suppression d'une source reconnue de danger éventuel, telle que la présence dans le milieu du travail d'une substance qui s'est révélée fortement cancérogène pour les animaux mais beaucoup s'interrogeraient sur la nécessité de prendre des mesures draconiennes lorsqu'on découvre qu'une colle contient des substances chimiques qui ont des propriétés mutagènes pour salmonella typhimurium. Il y a encore beaucoup de chemin à parcourir avec les tests de cancérogénèse à court terme.

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

TABLEAU Taux de réussite de certains tests à court terme. Les chiffres indiqués entre parenthèses renvoient au nombre de cancérogènes ou de non-cancérogènes testés.

TEST	SENSIBILITE	SPECIFICITE	REFERENCE
Salmonella/Ames	90% (175)	87% (108)	19.
Sammonella/Ames	63% (27)	79% (33)	72.
Salmonella/Ames	72% (65)	78% (26)	73.
Salmonella/Ames	91% (58)	92% (62)	41.
Salmonella/Ames	92% (98)	-	60.
Salmonella/Ames	65% (36)	81% (16)	30.
Salmonella/Ames	71% (51)	-	18.
Salmonella/Ames	95% (22)	44% (27)	71.
Salmonella/Ames	76% (82)	57% (7)	74.
E. coli pol A mutagenèse	69% (58)	75% (24)	73.
E. coli pol A mutagenèse	57% (44)	-	18.
Transformation cellulaire	91% (58)	97% (62)	[illegible]
Transformation cellulaire	81% (26)	-	18.
Test de Rabin	71% (58)	71% (62)	41.
Implants sous-cutanés	37% (58)	95% (62)	41.
Suppression de glandes sébacées	67% (58)	64% (62)	41.
Réduction du Tetrazolium	40% (58)	73% (62)	41.

TEST	SENSIBILITE	SPECIFICITE	REFERENCE
Micronucléus	43% (36)	81% (16)	30.
Micronucléus	68% (22)	-	18.
Micronucléus	58% (59)	82% (22)	75.
Spermatozoïde anormal	65% (36)	62% (16)	30.
Spermatozoïde anormal	68% (19)	-	18.
Synthèse fortuite de l'ADN	55% (22)	-	18.
Réparation de l'ADN	94% (16)	-	18.
Mutation létale dominante	32% (25)	-	18.
Echange in vitro entre chromatides soeurs	92% (26)	-	18.
Echange in vitro entre chromatides soeurs	85% (13)	-	[illegible].
Aberration chromosomique in vitro	48% (27)	73% (33)	72.
Aberration chromosomique	78% (27)	-	18.
Aberration chromosomique	82% (17)	-	18

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

REFERENCES

1. Ames, B.N.; McCann, J.; Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutation Research. Vol. 31, no. 6 (1975). p. 347-364

2. Maugh, T.H. Chemicals : how many are there? Science. Vol. 199, no. 4325 (1978). p. 162

3. Saffiotti, U.; Wagoner, J.K. Occupational carcinogenesis. Annals of the New York Academy of Science. Vol. 271 (1976). p. 1-516

4. Acheson, E.D. Towards a strategy for the detection of industrial carcinogens. British Journal of Cancer. Vol. 44, no. 3 (1981). p. 321-331

5. Kleinbaum, D.G.; Kupper, L.L.; Morgenstern, H. Epidemiologic research : principles and quantitative methods. Belmont : Lifetime Learning Publications, 1982

6. Case, R.A.M.; Hosker, M.E.; McDonald, D.B.; Pearson, J.T. Tumours of the urinary bladder in workman engaged in the manufacture and use of certain dyestuff in intermediates in the British chemical industry. British Journal of Industrial Medicine. Vol. 11 (1954). p. 75-104

7. Asbestos (IARC Monographs on the Evaluation . Carcinogenic Risk of Chemicals to Man). Lyon : International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1976

8. Crombie, I.K. The limitations of case-control studies in the detection of environmental carcinogens. Journal of Epidemiology and Community Health. Vol. 35, no. 4 (1981). p. 281-287

9. Clayson, D.B. Comparison between in vitro and in vivo tests for carcinogenicity : an overview. Mutation Reseach. Vol. 75, no. 2 (1980). p. 205-213

10. Ashby, J. The unique role of rodents in the detection of possible human carcinogens and mutagens. Mutation Research. Vol. 115, no. 2 (1983). p. 177-213

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

11. Brusick, D. Principles of genetic toxicology. New York : Plenum Press, 1980

12. Environmental Mutagen Information Center Newsletter. No. 2, Winter 1981/82

13. Ames, B.N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: Hollaender, A. (ed). Chemical mutagens : principles and methods for their detection. New York : Plenum, Vol. 1, 1971. p. 267-282

14. Levin, D.E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. A new salmonella tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens : a run of cytosines as a mutational hot-spot. Mutation Research. Vol. 94, no. 2 (1982). p. 315-330

15. Ames, B.N.; Durston, W.E.; Yamasaki, E.; Lee, F.D. Carcinogens are mutagens : a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. In: Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 70, no. 8 (1973). p. 2281-2285

16. McCann, J.; Springarn, N.E.; Kobori, J.; Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens : bacterial tester strains with R factor plasmids. In: Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 72, no. 3 (1975). p. 979-983

17. Ames, B.N.; Lee, F.D.; Durston, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. In: Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 70 (1973). p. 782-786

18. Hollstein, M.; McCann, J. Short-term tests for carcinogens and mutagens. Mutation Research. Vol. 65, no. 3 (1979). p. 133-226

19. McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test : assay of 300 chemicals. In: Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 72, no. 12 (1975b). p. 5135-5139

20. Green, M.H.L.; Muriel, W.J. Mutagen testing using trp+ reversion in Escherichia coli. Mutation Research. Vol. 38, no. 1 (1976). p. 3-32

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

21. Tanooka, H. Development and applications of Bacillus subtilis test systems for mutagens, involving DNA-repair deficiency and suppressible auxotrophic mutations. Mutation Research. Vol. 42, no. 1 (1977). p. 19-32

22. Chu, E.H.Y. Induction and analysis of gene mutations in mammalian cells in culture. In: Hollaender, A. (ed). Chemical mutagens : principles and methods for their detection. New York : Plenum, Vol. 2, 1971. p. 411-444

23. Mutagenesis assays with mammalian cells. In: Long-term and short-term screening assays for carcinogens : a critical appraisal. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man). Lyon : International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Suppl 2, 1980. p. 107-133

24. Cytogenic damage as an endpoint in short-term assay systems for detecting environmental carcinogens. In: Long-term and short-term screening assays for carcinogens : a critical appraisal. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man). Lyon : International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Suppl 2, 1980. p. 227-244

25. Lilly, L.J.; Bahner, B.; Magee, P.N. Chromosome aberrations induced in rat lymphocytes by N-nitroso compounds as a possible basis for carcinogen screening. Nature. Vol. 25[illegible] no. 5536 (1975). p. 611-612

26. Nishio, A.; DeFeo, F.; Cheng, C.C.; Uyeki, E.M. Sister chromatid exchange and chromosomal aberrations by DHAQ and related anthraquinone derivatives in Chinese hamster ovary cells. Mutation Research. Vol. 101, no. 1 (1982). p. 77-86

27. Perry, P.; Wolff, S. New Giemsa method of differential staining of sister chromatids. Nature. Vol. 251, no. 5471 (1974). p. 156-158

28. Takehisa, S.; Wolff, S. Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by carcinogenic mutagens requiring metabolic activation. Mutation Research. Vol. 45, no. 2 (1977). p. 263-270

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

29. Perry, P.; Evans, H.J. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature. Vol. 257, no. 5531 (1975). p. 121-125

30. Heddle, J.A.; Bruce, W.R. Comparison of tests for mutagenicity or carcinogenicity using assays for sperm abnormalities, formation of micronuclei, and mutations in Salmonella. In: Hiatt, H.; Watson, J.D.; Winsten, J.A. (eds). Origins of human cancer. Book A. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1977. p. 1549-1557

31. Cole, R.J.; Taylor, N.; Cole, J.; Arlett, C.F. Short-term tests for transplacentally active carcinogens. I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. Mutation Reseach. Vol. 80, no. 1 (1981). p. 141-157

32. San, R.H.C.; Stich, H.F. DNA repair synthesis of cultured human cells as a rapid bioassay for chemical carcinogens. International Journal of Cancer. Vol. 16, no. 2 (1975). p. 284-291

33. Zelle, B.; Bootsma, D. Repair of DNA damage after exposure to 4-nitroquinoline-1-oxide in heterokaryons derived from Xeroderma pigmentosum cells. Mutation Reseach. Vol. 70 (1980). p. 373-381

34. Williams, G.M. The status of in-vitro test systems utilizing DNA damage and repair for the screening of chemical carcinogens. Journal of Assoc. Off. Anal. Chem. Vol. 62, no. 3 (1979). p. 857-863

35. Garner, R.C.; Miller, E.C.; Miller, J.A. Liver microsomal metabolism of afla toxin B-1 to a reactive derivative toxic to Salmonella typhimurium TA 1530. Cancer Research. Vol. 32, no. 10 (1972). p. 2058-2066

36. Kada, T.; Hirano, K.; Shirasu, Y. Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with bacillus subtilis. In: de Serres, F.J.; Hollaender, A. (eds). Chemical mutagens : principles and methods for their detection. New York : Plenum Press. Vol. 6, 1980. p. 149-173

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

37. Stich, H.F.; San, R.H.C. DNA repair synthesis and survival of repair deficient human cells exposed to the K-region epoxide of benz(a)anthracene. In: Proceedings of the Social Experiments of Biological Medicine. Vol. 142, no. 1 (1972). p. 155-158

38. DiPaolo, J.A.; Casto, B.C. Chemical carcinogenesis. In: Gallo, R.C. (ed). Recent advances in cancer research. Cleveland : CRC Press, 1978. p. 17-47

39. Buick, R.N.; MacKillop, W.J. Measurement of self-renewal in culture of clonogenic cells from human ovarian carcinoma. British Journal of Cancer. Vol. 44, no. 3 (1981). p. 349-355

40. Transformation in cell culture. In: Long-term and short-term screening assays for carcinogens : a critical appraisal. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man). Lyon : International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Suppl 2, 1980. p. 185-199

41. Purchase, I.F.H.; Longstaff, E.; Ashby, J.; Styles, J.A.; Anderson, D.; Lefevre, P.A.; Westwood, F.R. Evaluation of six short-term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use. Nature. Vol. 264, no. 5587 (1976). p. 624-627

42. Pienta, R.J.; Poiley, J.A.; Lebherz III, W.B. Further evaluation of a hamster embryo cell carcinogenesis bioassay. In: Cancer protection and detection. New York : Marcel Dekker. Vol. 2, Chapter 23, 1977

43. Toth, B.; Magee, P.N.; Shulik, P. Carcinogenesis study with dimethylnitrosamine administered orally to adult and subsutaneously to newborn BALB/c mice. Cancer Research. Vol. 24 (1964). p. 1712-1721

44. Peacock, P.M. A short-term test for carcinogenicity : the effects of certain closely related polycyclic aromatic hydrocarbons on embryo tissue homografts in BALB/c strain mice. British Journal of Cancer. Vol. 16 (1962). p. 701-706

45. Allison, A.C. Potentiation of viral carcinogenesis by immunosuppression. British Medical Journal. Vol. 4, no. 732 (1970). p. 419-420

46. Kalter, H. Correlation between teratogenic and mutagenic effects of chemicals in mammals. In: Hollaender, A. (ed). Chemical mutagens : principles and methods for their detection. New York : Plenum Press. Vol. 1, 1971. p. 57-82

47. Stoltz, D.R.; Poirer, L.A.; Irving, C.L.; Stich, H.F.; Weisburger, J.H.; Grice, H.C. Evaluation of short-term tests for carcinogenicity. Toxicology and Applied Pharmacology. Vol. 29, no. 2 (1974). p. 157-180

48. Neubert, D. Teratogenicity : any relationship to carcinogenicity? In: Montesano, R.; Bartsch, H.; Tomatis, L. (eds). Molecular and cellular aspects of carcinogen screening tests. (IARC Scientific Publication no. 27). Lyon : International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1980. p. 169-178

49. Svoboda, D.; Racela, A.; Higginson, J. Variations in ultra-structural nuclear changes in hepatocarcinogenesis. Biochemical Pharmacology. Vol. 16, no. 4 (1967). p. 651-657

50. Williams, D.J.; Rabin, B.R. Disruption by carcinogens of the hormone dependent association of membranes with polysomes. Nature. Vol. 232, no. 5306 (1971). p. 102-105

51. Reynolds, R.C.; Montgomery, P.O.B.; Hughes, B. Nucleolar "caps" produced by actinomycin D. Cancer Research. Vol. 24 (1964). p. 1269-1278

52. Bridges, B.A. Short-term screening tests for carcinogenicity. Nature. Vol. 261, no. 5557 (1976). p. 195-200

53. Bock, F.G.; Mund, R. A survey of compounds for activity in the suppression of mouse sebaceous glands. Cancer Research. Vol. 18 (1958). p. 887-892

54. Ashby, J.; Longstaff, E. Activity of 4 chloromethyl biphenyl in the mouse skin sebaceous gland suppression test. Mutation Research. Vol. 100, no. 1-4 (1982). p. 391-393

55. Iversen, O.H.; Evenson, A. Experimental skin carcinogenisis in mice. Acta Pathobiologica et Microbiologica Scandinavica. Suppl no. 156 (1962). p. 11

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario Canada L8N 1H6

56. McPherson, F.; Bridges, J.W.: Parke, D.V. In-vitro enhancement of hepatic microsomal biphenyl-2-hydroxylation by carcinogens. Nature. Vol. 252, no. 5483 (1974). p. 488-489

57. Szent-Gyorgyi, A.; Isenberg, I.; Baird, S. On the electron donating properties of carcinogens. Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 46 (1960). p. 1444

58. Szent-Gyorgyi, A.; McLaughlin, J. Reaction of carcinogens with acridine. Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 47 (1961). p. 1397

59. Purchase, I.F.H.; Longstaff, E.; Ashby, J.; Styles, J.A.; Anderson, D.; Lefevre, P.A.; Westwood, F.R. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. British Journal of Cancer. Vol. 37, no. 6 (1978). p. 873-895

60. Sugimura, T.; Sato, S.; Nagao, M.; Yahagi, T.; Matsushima, T.; Seino, Y.; Takeuchi, M.; Kawachi, T. Overlapping of carcinogens and mutagens. In: Magee, P.N.; Takayama, S.; Sugimura, T.; Matsushima, T. (eds). Fundamentals in cancer prevention. Baltimore : University Park Press, 1976. p. 191-215

61. Zimmerman, F.K. Can we determine mutagenicity or only a mutagenic potential? Mutation Research. Vol. 92, no. 1-2 (1982). p. 3-7

62. Bennett, B.M. On comparisons of sensitivity, specificity and predictive value of a number of diagnostic procedures. Biometrics. Vol. 28, no. 3 (1972). p. 793-800

63. Lusted, L.B. Introduction to medical decision making. Springfield, Illinois : Charles C. Thomas, 1968

64. Choi, B.C.K. Index for rating predictive accuracy of screening tests. Methods for Information in Medicine. In press

65. Vecchio, T.J. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. New England Journal of Medicine. Vol. 274, no. 21 (1966). p. 1171-1173

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

66. Cooper, J.A.; Saracci, R.; Cole, P. Describing the validity of carcinogen screening tests. British Journal of Cancer. Vol. 39, no. 1 (1979). p. 87-89

67. Bartsch, H. Predictive value of mutagenicity tests in chemical carcinogensis. Mutation Research. Vol. 38, no. 3 (1976). p. 177-190

68. Bartsch, H.; Malaveille, C.; Camus, A.M.; Brun, G.; Hante-feuille, A. Validity of bacterial short-term tests for the detection of chemical carcinogens. In: Norpoth, K.H.; Garner, R.C. (eds). Short-term mutagenicity test systems for detecting carcinogens. Berlin : Springer-Verlag, 1980. p. 58-73

69. McCann, J.; Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test : assay of 300 chemicals : discussion. In: Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 73, no. 3 (1976). p. 950-954

70. McCann, J.; Ames, B.N. The salmonella/microsome mutagenicity test : predicitive value for animal carcinogenicity. In: Hiatt, H.H. (ed). Origins of human cancer. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1977. p. 1431-1450

71. Glatt, H.R.; Schwind, H.; Schechtman, L.M.; Beard, S.; Kouri, R.E.; Zajdela, F.; Croisy, A.; Perin, F.; Jacquignon, P.C.; Oesch, F. Mutagenicity of closely related carcinogenic and non-carcinogenic compounds using various metabolizing systems and target cells. In: Norpoth, K.H.; Garner, R.C. (eds). Short-term mutagenicity test systems for detecting carcinogens. Berlin : Springer-Verlag, 1980. p. 103-126

72. Odashima, S. The cooperative development in Japan of methods for screening chemicals for carcinogenicity. In: Montesano, R.; Bartsch, H.; Tomatis, T. (eds). (IARC Scientific Publicaton no. 12). Screening tests in chemical carcinogenesis. Lyon : International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1976. p. 61-75

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6

73. Poirier, L.A. Mutagenicity screening tests for carcinogenicity. In: Montesano, R. (eds). (IARC Scientific Publication no. 12). Screening tests in chemical carcinogensis. Lyon : International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1976

74. Bartsch, H.; Malaveille, C.; Camus, A.M.; Martel-Planche, G.; Brun, G.; Hantefeuille, A.; Sabadie, N.; Barbin, A.; Kuroki, T.; Drevon, C.; Piccoli, C.; Montesano, R. Validation and comparative studies on 180 chemicals with Salmonella typhimurium strains and V-79 Chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. Mutation Research. Vol. 76, no. 1 (1980). p. 1-50

75. Jenssen, D.; Ramel, C. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. Mutation Research. Vol. 75, no. 2 (1980). p. 191-201

CCOHS/CCHST
250 Main Street E./250 rue Main est
Hamilton, Ontario, Canada L8N 1H6